



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



NICOLE LANGONI RAMOS

**ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE COLÁGENO COM CORANTES E
SAL METÁLICO E INTERAÇÃO COM CÉLULAS HFF**

UBERLÂNDIA - MG

JULHO/2025

NICOLE LANGONI RAMOS

**ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE COLÁGENO COM CORANTES E
SAL METÁLICO E INTERAÇÃO COM CÉLULAS HFF**

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada ao curso de Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Uberlândia
como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Jair Pereira da Cunha Júnior

UBERLÂNDIA - MG

JULHO/2025

NICOLE LANGONI RAMOS

**ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DE COLÁGENO COM CORANTES E
SAL METÁLICO E INTERAÇÃO COM CÉLULAS HFF**

Data de aprovação: 20/08/2025

BANCA DE EXAMINAÇÃO:

Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior –

Professor Associado IV – ICBIM

Prof. Dr. Elisângela Rosa da Silva –

Professor Associado II – ICBIM

Prof. Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro –

Professor Titular - FAMED

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha família, que me apoiou e incentivou na escolha desse curso extraordinário. Ao meu irmão, Felipe Langoni Ramos, que segue seu sonho de infância e agora demonstra orgulho ao me ver seguindo o meu. Aos meus pais, que me proporcionaram o que precisei para ingressar nesta faculdade. À minha prima Isadora Fernandes Resende Costa, que acompanhou minha jornada e expressa imensa felicidade pelas minhas conquistas pessoais e acadêmicas. Ao seu irmão Thiago Fernandes Resende Costa, que eu gostaria extremamente que estivesse presente hoje pois sempre expressou sua admiração pela minha escolha de profissão.

Agradeço também à minha melhor amiga Ester Martins Rosa, que me auxiliou em todo o processo, emocionalmente e academicamente, e às minhas colegas de classe Vanessa Morgenstern, Taciara Silva, Roberta Yukawa e Daniela Pedrosa, por oferecem extrema ajuda acadêmica durante esses oito períodos.

E por fim, ao meu orientador Jair Pereira da Cunha Júnior, que me direcionou nesse projeto com profunda sabedoria, compreensão, paciência e prioridade pelo meu bem-estar pessoal no laboratório.

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVOS	9
2.1 OBJETIVO GERAL	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3. MATERIAIS	10
4. METODOLOGIA	11
4.1 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA	11
4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	11
4.2.1 ELETROFORESE	11
4.2.2 ESPECTROFOTOMETRIA	11
4.3 APLICAÇÕES EXPERIMENTAIS	12
4.3.1 CULTURA DE CÉLULAS HFF	12
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
5.1 ELETROFORESE	13
5.2 ESPECTROFOTOMETRIA	14
5.3 CULTURA DE CÉLULAS HFF	20
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
7. REFERÊNCIAS	28

RESUMO

O colágeno é a principal proteína estrutural do tecido conjuntivo e exerce papel fundamental na integridade da matriz extracelular (MEC). A gelatina, derivada de sua hidrólise, é amplamente utilizada como modelo experimental em estudos bioquímicos e celulares. Corantes como Orange G e Ponceau S são usados para marcação de proteínas, enquanto o sulfato de cobre (CuSO_4), embora útil em testes bioquímicos, apresenta potencial citotóxico. Este estudo buscou caracterizar a gelatina por SDS-PAGE e investigar, por espectrofotometria UV-Vis e cultura celular, os efeitos desses compostos em proteínas e fibroblastos humanos (HFF). A gelatina foi caracterizada por eletroforese SDS-PAGE, com análise das bandas proteicas. Para avaliar interações proteína-molécula, foram obtidos espectros UV-Vis de gelatina isolada e associada aos corantes ou CuSO_4 . Em seguida, fibroblastos HFF foram cultivados e expostos aos compostos nas concentrações de 0,0001%, 0,001% e 0,01%, sendo observados morfologicamente após 0h e 24h. A gelatina apresentou o perfil proteico característico, com cadeias α (~100–120 kDa), dímeros β (~200 kDa) e padrão polidisperso típico de colágeno desnaturado. Na espectrofotometria, Orange G e Ponceau S mostraram picos característicos e interação fraca com a proteína, sem alterar significativamente o espectro. O CuSO_4 apresentou aumento discreto da absorbância na faixa de 220–240 nm, sugerindo formação de complexos proteína-metal. Nas culturas celulares, Orange G e Ponceau S não causaram alterações relevantes até 0,001%, apresentando apenas leve redução de confluência em 0,01%. O CuSO_4 exibiu citotoxicidade dose-dependente, com pequenas mudanças morfológicas a partir de 0,001%, sendo mais intensa a 0,01%, em concordância com relatos de estresse oxidativo induzido por cobre. Os corantes Orange G e Ponceau S mostraram-se seguros para fibroblastos até 0,001%, enquanto o CuSO_4 demonstrou toxicidade em concentrações relativamente baixas, destacando a necessidade de cautela em seu uso experimental. Os resultados contribuem para padronização de ensaios envolvendo os compostos estudados em cultura celular e para futuras aplicações em bioengenharia de tecidos e toxicologia.

Palavras-chave: gelatina, colágeno, eletroforese SDS-PAGE, Orange G, Ponceau S, sulfato de cobre, espectrofotometria, fibroblastos, HFF.

ABSTRACT

Collagen is the main structural protein of connective tissue and plays a crucial role in the integrity of the extracellular matrix (ECM). Gelatin, derived from its hydrolysis, is widely used as an experimental model in biochemical and cell-based studies. Dyes such as Orange G and Ponceau S are commonly employed for protein staining, whereas copper sulfate (CuSO_4), despite its utility in biochemical assays, exhibits cytotoxic potential. This study aimed to characterize gelatin by SDS-PAGE and investigate, through UV-vis spectrophotometry and cell culture assays, the effects of these compounds on proteins and human foreskin fibroblasts (HFF). Gelatin was characterized by SDS-PAGE, with analysis of protein bands. UV-Vis spectra of gelatin alone and in combination with the dyes or CuSO_4 were obtained to assess protein–molecule interactions. HFF cultures were then treated with the compounds at 0.0001%, 0.001%, and 0.01%, and morphologically evaluated at 0 h and 24 h. Gelatin exhibited the characteristic protein profile, with α -chains (~100–120 kDa), β -dimers (~200 kDa), and the polydisperse pattern typical of denatured collagen. In spectrophotometry, Orange G and Ponceau S displayed characteristic peaks and weak interaction with the protein, without major spectral changes. CuSO_4 showed a slight increase in absorbance between 220–240 nm, suggesting protein–metal complex formation. In cell cultures, Orange G and Ponceau S caused no relevant alterations up to 0.001%, with only a mild decrease in confluence at 0.01%. CuSO_4 exhibited dose-dependent cytotoxicity, with slightly morphological changes from 0.001%, more pronounced at 0.01%, consistent with reports of copper-induced oxidative stress. The Orange G and Ponceau S were safe for fibroblasts up to 0.001%, whereas CuSO_4 showed toxicity at relatively low concentrations, highlighting the need for caution in its experimental use. These results contribute to the standardization of assays involving the studied compounds in cell culture and support future applications in tissue engineering and toxicology.

Keywords: gelatin, collagen, SDS-PAGE electrophoresis, Orange G, Ponceau S, copper sulfate, spectrophotometry, fibroblasts, HFF.

1. INTRODUÇÃO

O colágeno é uma proteína estrutural fibrosa presente no tecido conjuntivo de diversos órgãos do corpo humano. Ele constitui aproximadamente 25 a 35% do total de proteínas corporais e encontra-se distribuído na pele, ossos, cartilagens, tendões, vasos sanguíneos, córneas e dentes, sendo essencial para garantir a integridade e a resistência mecânica desses tecidos (RICARD-BLUM, 2011).

Entre os diversos tipos conhecidos, o colágeno tipo I é o mais abundante, desempenhando um papel fundamental na estruturação da matriz extracelular (MEC), além de participar de processos como cicatrização, regeneração celular e sustentação de tecidos epiteliais e conjuntivos (SHOULDERS; RAINES, 2009). Essas características tornam o colágeno objeto de amplo interesse científico e tecnológico, com aplicações que vão desde a indústria alimentícia – na produção de gelatinas, iogurtes e embutidos – até o setor cosmético, em produtos voltados para a melhoria da elasticidade da pele e saúde capilar. No campo médico e farmacêutico, o colágeno é utilizado na formulação de cápsulas, suplementos, curativos regenerativos e como material-base na bioengenharia de tecidos (SILVA et al., 2014; FERREIRA et al., 2020).

Quanto aos outros tipos de colágeno, o tipo II está presente predominantemente na cartilagem hialina, como a dos joelhos e outras articulações, conferindo resistência à compressão e sendo essencial para a integridade das cartilagens articulares (BÄCHINGER et al., 2010). Ele também é encontrado nos discos intervertebrais, no humor vítreo e no septo nasal (EYRE et al., 2002). Já o tipo III, um colágeno fibrilar que frequentemente coexiste com o tipo I, está presente em tecidos que necessitam de elasticidade e flexibilidade, como pele, pulmões, vasos sanguíneos e órgãos internos (RICARD-BLUM, 2011).

O colágeno tipo IV, diferentemente dos fibrilares, forma uma rede tridimensional em lâminas, compondo a membrana basal e atuando na sustentação de tecidos epiteliais, regulando adesão, migração, proliferação e diferenciação celular (KHOSHNOODI et al., 2008). O tipo V, por sua vez, regula a formação e o diâmetro dos fibrilos de colágeno tipo I e é característico da cartilagem de crescimento e de regiões calcificadas, participando da ossificação endocondral e do crescimento esquelético (BIRK, 2001; GIRKONTAITE et al., 1996).

Clinicamente, diferentes tipos de colágeno apresentam aplicações específicas: os tipos I e III são usados em suplementos para pele e tecidos conjuntivos, o tipo II em tratamentos articulares e o tipo IV em estratégias de bioengenharia (POSTLETHWAITE et al., 2008; CROWLEY et al., 2009; MALFAIT et al., 2017). Nos últimos anos, o colágeno tipo I tem despertado grande interesse na pesquisa oncológica, particularmente no estudo de cânceres relacionados à MEC, como o melanoma. Este é um tipo agressivo de câncer de pele originado nos melanócitos, cuja progressão é fortemente influenciada pelas propriedades do microambiente tumoral. Alterações na densidade, organização e rigidez do colágeno tipo I na MEC podem modular o comportamento das células tumorais, afetando a migração, a invasividade e a resposta a sinais químicos (LEVENTAL et al., 2009; XU et al., 2019).

Para investigar essas interações em condições controladas, a gelatina comercial incolor - produto da hidrólise parcial do colágeno - é amplamente utilizada como substituto experimental em estudos físico-químicos e celulares. A gelatina mantém a estrutura de tripla hélice parcialmente desnaturada do colágeno, conferindo propriedades semelhantes de gelificação e interação celular (ZHU et al., 2019).

Devido à sua relevância experimental, três diferentes substâncias foram avaliadas. A primeira, o Orange G (C.I. 16230) é um corante azo de caráter ácido, amplamente utilizado em técnicas de eletroforese, especialmente na coloração de proteínas e na marcação de frente de corrida, devido ao seu baixo peso molecular e capacidade de migrar rapidamente no gel. Apresenta um grupo azo ($-N=N-$) responsável por sua coloração laranja intensa e afinidade por resíduos básicos das proteínas, ligando-se principalmente a lisina e arginina. Além de bioquímica, é usado em histologia para diferenciar componentes citoplasmáticos (BANCROFT; GAMBLE, 2008) e em citologia para coloração rápida. Não é considerado altamente tóxico, mas pode causar irritação dérmica e ocular em contato direto, exigindo manuseio com EPIs (HARVEY, 2010).

O segundo, o Ponceau S (C.I. 27195), é um corante aniônico solúvel em água utilizado para coloração reversível de proteínas em membranas de nitrocelulose ou PVDF após eletrotransferência. Sua principal vantagem é a reversibilidade, permitindo visualização das proteínas antes de imunomarcações subsequentes, sem comprometer a integridade da amostra (BLOT; SPILLER; BOUCHER, 2011). É

considerado de baixa toxicidade, mas o contato prolongado pode causar irritação, sendo recomendado uso de luvas (ROMERO-CANELÓN et al., 2015).

O terceiro, o Sulfato de Cobre (CuSO_4), é um sal inorgânico azul cristalino amplamente utilizado em bioquímica como fixador, corante e reagente no teste de Biureto para quantificação de proteínas. É também empregado em microbiologia para controle de algas e fungos, na indústria agrícola como fungicida e na química analítica como agente oxidante (DANG et al., 2019). Contudo, apresenta propriedades citotóxicas relacionadas à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), podendo induzir estresse oxidativo, danos ao DNA e apoptose celular em altas concentrações (DAI et al., 2021). Por isso, seu uso em cultura celular requer cuidados com concentração e tempo de exposição.

Como modelo biológico, foram utilizados fibroblastos humanos de prepúcio (HFF - *Human Foreskin Fibroblasts*), amplamente empregados em pesquisas sobre adesão, migração, regeneração tecidual e citocompatibilidade de biomateriais. Esses fibroblastos possuem elevada capacidade proliferativa e mantêm funções fisiológicas importantes, como a produção de colágeno e a reorganização da MEC, sendo úteis para simular processos de cicatrização e remodelamento tecidual (BAI et al., 2015).

Por serem fibroblastos primários, apresentam maior estabilidade genética e fisiológica do que linhagens imortalizadas, expressando marcadores como vimentina, fibronectina e colágeno tipo I, características que os tornam adequados para avaliação de citotoxicidade, resposta a fármacos e interação com substratos diversos (VAN DEN BROECK et al., 2021; JIN et al., 2018; GARCÍA-RODRÍGUEZ et al., 2018; ZHANG et al., 2020).

Considerando a relevância estrutural e funcional do colágeno, sua diversidade de aplicações biomédicas e industriais, bem como seu papel fundamental em processos fisiológicos e patológicos, como na progressão do melanoma, torna-se essencial o estudo de seus derivados e modelos experimentais.

Dessa forma, este trabalho tem como objetivo investigar a interação entre gelatina comercial e diferentes agentes corantes (Orange G, Ponceau S) e sal de cobre (CuSO_4), avaliando não apenas a caracterização físico-química por técnicas como espectrofotometria UV-Vis e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), mas também a resposta celular em culturas de fibroblastos humanos (HFF).

É esperado que os resultados obtidos reforcem a utilização da gelatina como modelo experimental para estudos de matriz extracelular, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias em engenharia de tecidos, biomateriais e pesquisas voltadas à biologia tumoral.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar espectrofotometricamente a interação entre os corantes Orange G, Ponceau S e CuSO_4 com colágeno e células HFF.

2.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar o colágeno da gelatina por eletroforese (SDS-PAGE);
2. Testar a interação do colágeno com corantes em espectrofotometria;
3. Analisar o efeito dos corantes em cultura de células HFF.

3. MATERIAIS

Equipamentos

1. Microscópio óptico e microscópio digital (AMG EVOS);
2. Leitor de microplacas com software Gen5 (BioTek Instruments);
3. Sistema de eletroforese vertical (cubas, fonte de corrente);
4. Micro-ondas de uso comum para solubilização de gelatina;
5. Computador para análise de dados, com softwares Prism 9 e Excel;
6. Pipetas e ponteiros estéreis;
7. Provetas, béqueres e tubos Falcon/Eppendorf;
8. Cabine de biossegurança para cultivo celular;
9. Estufa para cultivo celular;
10. Centrífuga (quando aplicável para preparo de amostras).

Consumo

1. Gelatina incolor (marca Mãe Natureza);
2. Corantes Orange G e Ponceau S;
3. Sulfato de cobre (CuSO_4);
4. Gel de poliacrilamida 8% e solução de Coomassie Brilliant Blue R-50;
5. Tampão de amostra (Tris, EDTA, glicerol, SDS) e solução de descoloração (ácido acético + metanol);
6. Padrão molecular Novex Sharp Pre-stained;
7. Microplacas de 96 poços e placas de cultivo celular de 48 poços;
8. Solução salina tamponada com fosfato (PBS);
9. Meio de cultura DMEM (alta glicose) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino e 1% antibiótico/antimicótico;
10. Trypsina-EDTA para descolamento celular;
11. Luvas de nitrilo, máscaras descartáveis e jalecos esterilizados;
12. Água Milli-Q para preparo de soluções.

4. METODOLOGIA

4.1 Preparação da amostra

Foi utilizada gelatina incolor preparada a 0,1% com solubilização em água milli-Q. Em um béquer de vidro, a mistura foi aquecida por 10 segundos em um microondas de utilização comum.

4.2 Análises bioquímicas

4.2.1 Eletroforese

As proteínas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS), segundo o método de Laemmli (1970). O gel de poliacrilamida a 8% foi preparado em placas de $8 \times 10 \times 0,075$ cm, e as amostras de gelatina (0,1%) foram previamente solubilizadas em tampão de amostra contendo Tris 25 mM (pH 6,8), EDTA 10 mM, glicerol 10% e SDS 10% (4:1, v:v), seguido de desnaturação térmica a 95 °C por 5 minutos (HAMES, 1998; SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

No gel, foi aplicado 4 µL do padrão molecular Novex, sendo os cinco poços subsequentes carregados com diferentes volumes da amostra (20 µL, 15 µL, 10 µL, 5 µL e 2,5 µL). A corrida eletroforética foi conduzida sob corrente constante de 26 mA durante 50 minutos. Após a separação, os géis foram corados com solução de Coomassie Brilliant Blue R-50 e descorados em solução contendo 7% de ácido acético e 30% de metanol, permitindo a visualização das bandas proteicas.

4.2.2 Espectrofotometria

As análises espectrofotométricas foram realizadas em leitor de microplacas acoplado ao software Gen5 (Epoch BioTek Instruments). As amostras de gelatina a 0,1%, na presença e ausência dos corantes Orange G 0,0001%, Ponceau S 0,0001% e CuSO₄ 0,1%, foram distribuídas em microplaca (BIORAD) de 96 poços de fundo transparente, em volume de 200 µL por poço. As leituras foram obtidas no modo

“Absorbance”, utilizando a função de varredura (“sweep”) na faixa de 200 a 700 nm. O espectro foi adquirido pelo software, com registro automático dos valores de absorbância ao longo de todo o intervalo espectral com intervalos de 10 nm em 10 nm, subsequentemente. Para correção de fundo (controle negativo), foi aplicado o veículo das amostras (água Milli-Q, sem proteína ou corante) como “branco” da reação. Os dados foram exportados pelo Gen5 em formato .xlsx do Excel para análise subsequente.

4.3 Aplicações experimentais

4.3.1 Cultura de células HFF

As células HFF (Human Foreskin Fibroblasts) foram cultivadas na quantidade de 25×10^3 no volume de 300 μ L por poço, em placa estéril de 48 poços, utilizando DMEM com alta glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico penicilina/streptomicina (Thermo Corp). Em sequência, os poços foram divididos em grupos para tratamento com três tipos de corantes: Orange G, Ponceau S e CuSO_4 , em diferentes concentrações (0; 0,0001; 0,001; 0,01%). Foram então realizadas quadruplicatas de cada tratamento com os respectivos corantes. As células foram monitoradas em dois momentos – zero e 24 horas da aplicação dos compostos. Após cada período de tempo, as células foram avaliadas em microscópio óptico para observação de morfologia e possíveis alterações celulares. As fotomicrografias foram registradas em microscópio digital AMG EVOS.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Eletroforese

A corrida eletroforética da gelatina apresentou padrão característico de proteínas colagenosas desnaturadas (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011), conforme demonstrado na figura 1. Observou-se a presença de bandas na faixa de 100-120 kDa, atribuídas às cadeias α , e outra na faixa de aproximadamente 200 kDa, correspondente a dímeros β (NIKOO et al., 2016). Além disso, foi identificado um arraste (“smear”) contínuo que se estende por diferentes regiões do gel, refletindo a polidispersidade da amostra, típica de gelatinas comerciais que foram submetidas a hidrólise parcial (MAKRIDIS et al., 2021).

A intensidade de coloração das bandas aumentou proporcionalmente à quantidade de amostra carregada, confirmando relação qualitativa entre a concentração de proteína aplicada no gel e a respectiva da coloração do gel. Esse padrão é compatível com relatos da literatura que descrevem a composição de gelatinas industriais, nas quais predominam cadeias α , fragmentos hidrolisados e oligômeros derivados do colágeno original (BÄCHINGER et al., 2005).

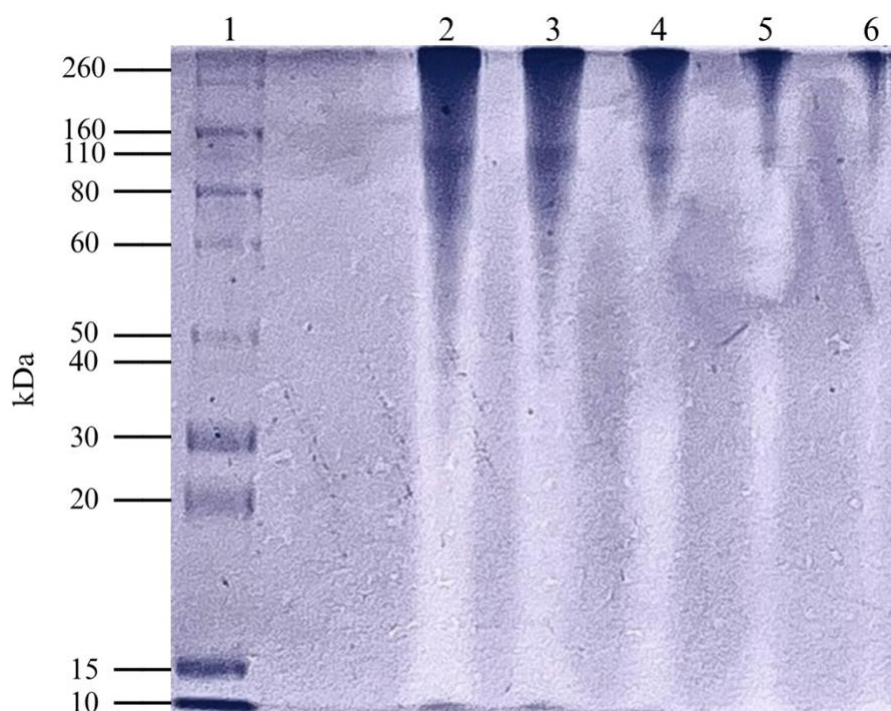


Figura 1: Perfil eletroforético da gelatina comercial, evidenciando cadeias α (~100-120 kDa), dímeros β (~200 kDa) e padrão polidisperso característico de colágeno desnaturado. 1 - Padrão Novex; 2 - amostra 20 μ L; 3 - amostra 15 μ L; 4 - amostra 10 μ L; 5 - amostra 5 μ L; 6 - amostra 2,5 μ L.

Dessa forma, os resultados obtidos confirmam que a gelatina utilizada possui natureza polidispersa, apresentando fragmentos de diferentes massas moleculares que conferem heterogeneidade à amostra. Esse comportamento torna a gelatina um modelo adequado para o estudo de interações proteína–corante em sistemas aquosos, como já descrito em aplicações biomédicas e alimentícias (GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011; MAKRIDIS et al., 2021).

Além disso, a presença do “arraste” eletroforético indica que, além de cadeias intactas, existem fragmentos de degradação, o que amplia sua semelhança com microambientes fisiológicos onde a matriz extracelular está em remodelamento constante. Esse aspecto justifica o uso da gelatina não apenas como substituto experimental de colágeno purificado, mas também como base em estudos de biomateriais aplicados à engenharia de tecidos (MAKRIDIS et al., 2021).

5.2 Espectrofotometria

A espectrofotometria foi conduzida para avaliar os perfis de absorção dos corantes Orange G e Ponceau S, bem como do sal metálico CuSO_4 , em interação com a gelatina, utilizando água como controle negativo (branco). As leituras foram divididas em duas faixas: 200-290 nm, correspondente ao ultravioleta próximo, onde predominam absorções associadas a ligações peptídicas e resíduos aromáticos das proteínas (CARTER; RAZA, 1979; SREERAMA; WOODY, 2000), e 300-700 nm, região onde se observam os picos característicos dos corantes no espectro visível (NARAYANAN; RATH, 2017). A figura 02, demonstra o perfil espectrofotométrico obtido de 200 a 700 nm.

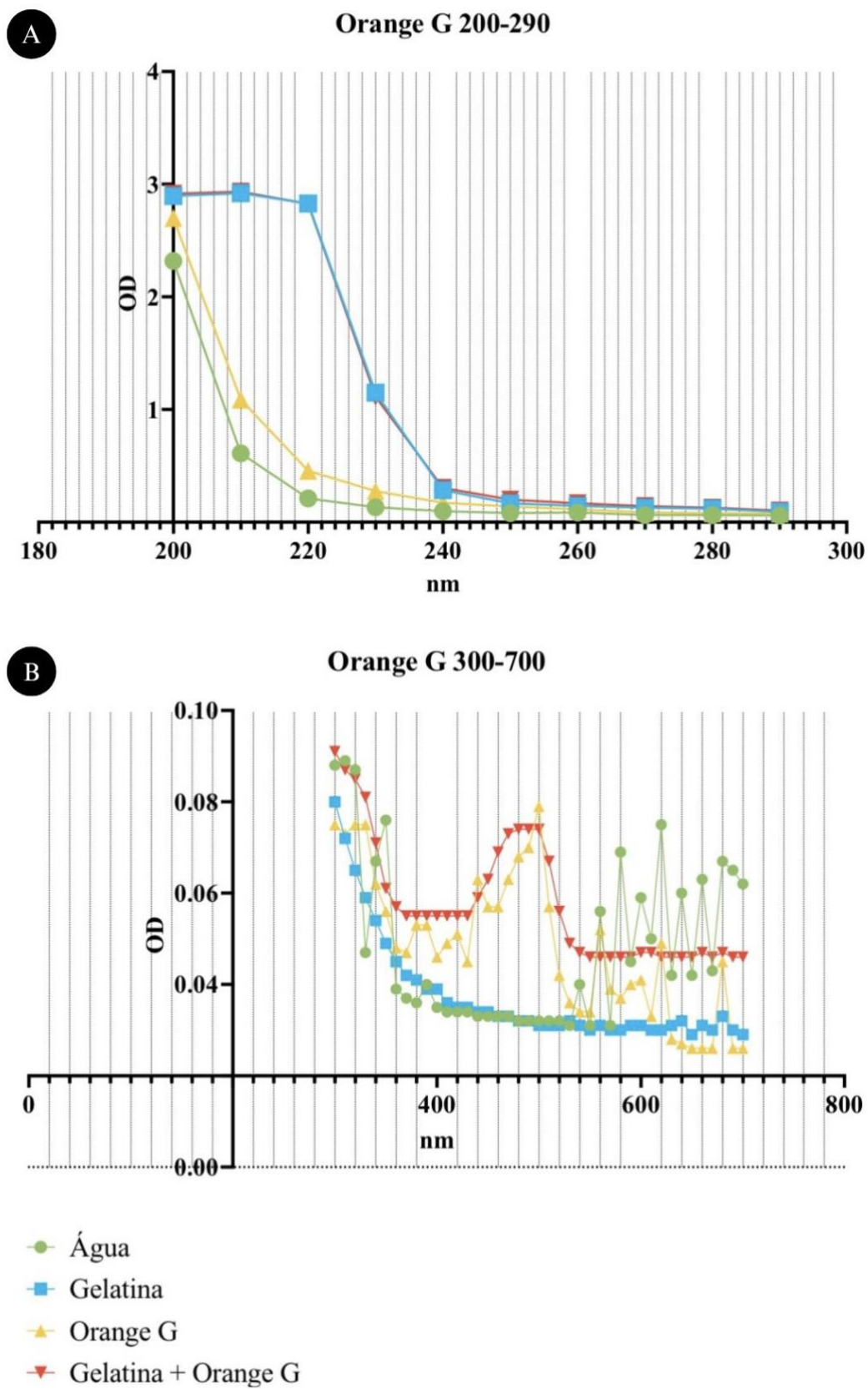


Figura 2: Espectros de absorção UV-Vis de gelatina na presença e ausência do corante Orange G.

Com Orange G, na faixa de 200-290 nm (figura 2A), a gelatina apresentou absorção intensa até ~220 nm, característica de ligações peptídicas (BÄCHINGER et al., 2005). O Orange G, por sua vez, mostrou valores menores nessa região, e a mistura gelatina + Orange G resultou em sobreposição dos perfis, sem alterações significativas, indicando que o corante não interferiu de forma relevante na absorção intrínseca da proteína. Na região de 300-700 nm (figura 2B), o Orange G exibiu absorção em torno de 470-480 nm, compatível com seu máximo de absorbância descrito na literatura (LILLIE, 1977).

Quando associado à gelatina, a curva apresentou discreto aumento da absorbância nessa faixa, o que sugere uma interação superficial e de baixa afinidade entre o corante e a proteína. Esse comportamento está de acordo com relatos de baixa toxicidade e baixa reatividade do Orange G frente a macromoléculas biológicas (IWASAKI et al., 2015).

A figura 3 apresenta os resultados dos registros espectrofotométrico da gelatina, na presença e ausência do corante Ponceau S.

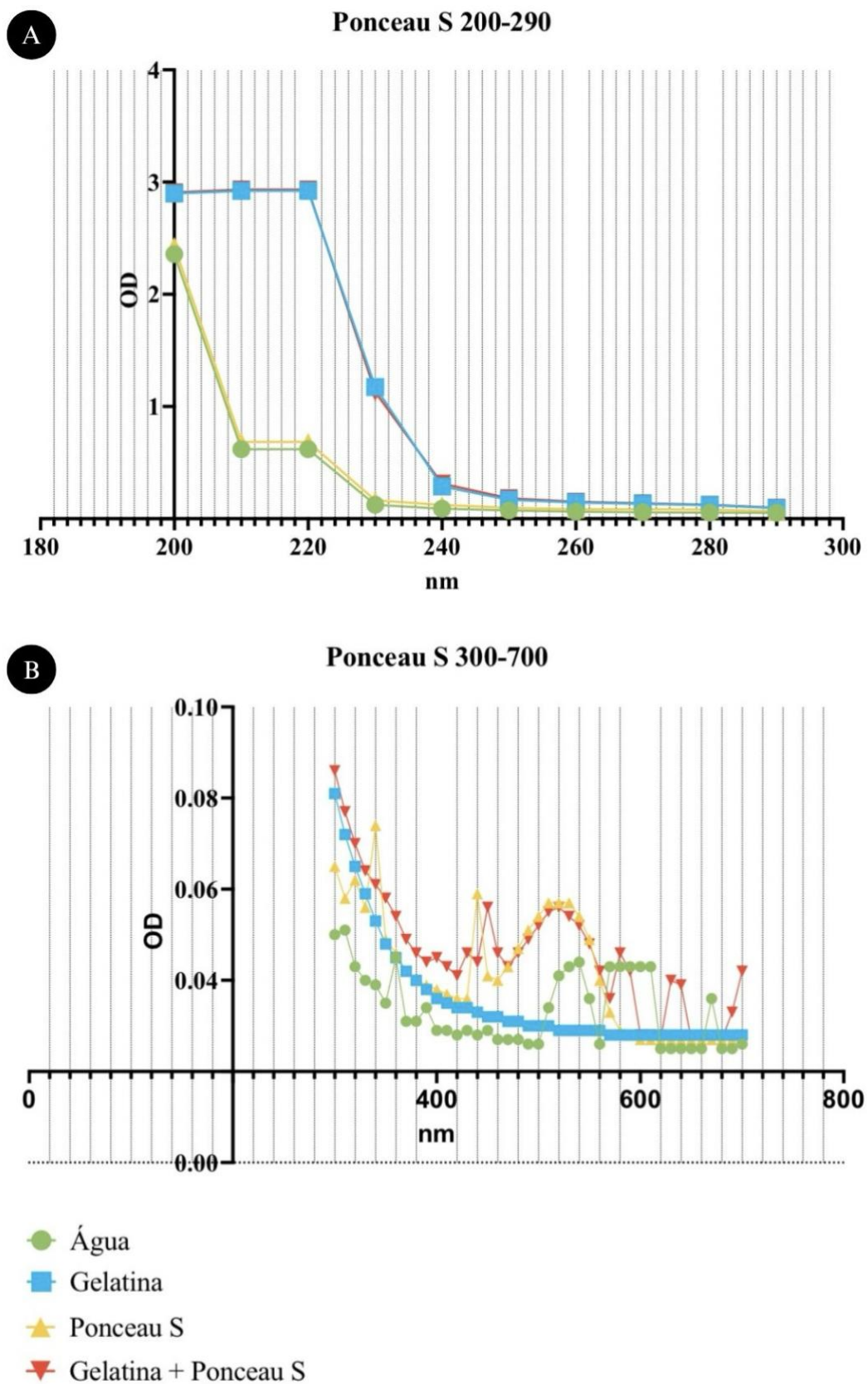


Figura 3: Espectros de absorção UV-Vis de gelatina na presença e ausência do corante Ponceau S.

Com Ponceau S, na faixa de 200-290 nm (figura 3A), o espectro da gelatina manteve-se semelhante ao do controle preparado somente com gelatina. Uma modificação muito discreta no perfil entre 210-230 nm na mistura gelatina + Ponceau foi observada. Esse aumento discreto pode indicar interações entre o corante e resíduos básicos da proteína, compatíveis com a característica do Ponceau S de se ligar de forma reversível a cadeias polipeptídicas (BLOTTNER; CZECH, 1992). o Ponceau S apresentou perfil próximo do controle realizado somente com água.

Na região de 300-700 nm (figura 3B), observou-se o pico característico do Ponceau S em torno de 520 nm (MATSUMOTO et al., 2021).

A associação com a gelatina resultou em um leve aumento da absorbância nessa faixa, reforçando a hipótese de interação fraca, mas detectável, entre o corante e a proteína. Essa característica explica seu uso como corante transitório, capaz de se ligar e ser removido facilmente sem desnaturar a proteína (BLOTTNER; CZECH, 1992; MATSUMOTO et al., 2021).

A figura 4 apresenta os resultados dos registros espectrofotométrico da gelatina, na presença e ausência do sulfato de cobre.

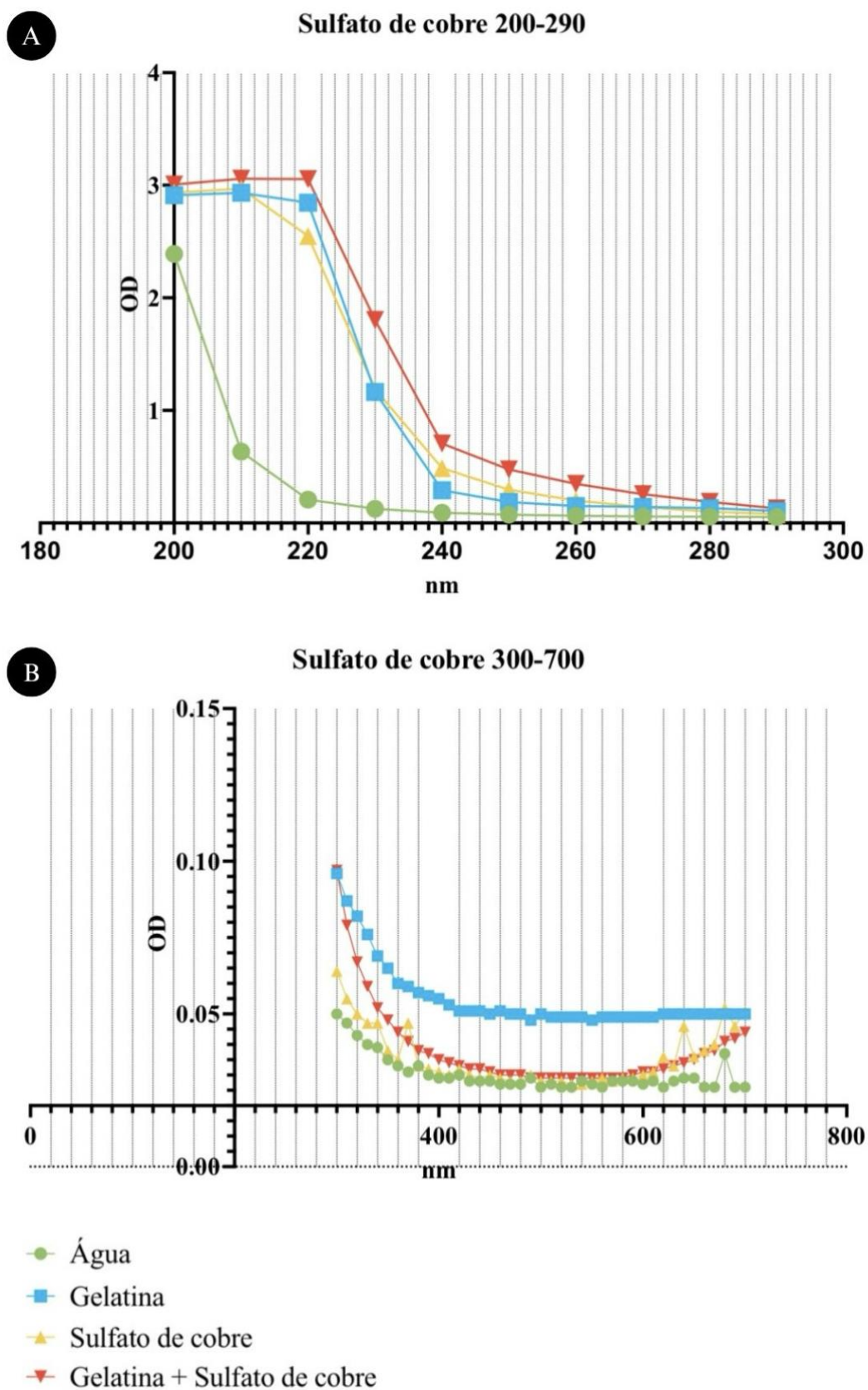


Figura 4: Espectros de absorção UV-Vis de gelatina na presença e ausência do sal inorgânico CuSO_4 .

Com sulfato de cobre, no espectro de 200-290 nm (figura 4A), o CuSO_4 apresentou perfil semelhante ao da gelatina, mas a mistura gelatina + sulfato de cobre mostrou discreto aumento da absorbância entre 220-240 nm, sugerindo interação do íon cúprico com grupos peptídicos e aromáticos das cadeias proteicas (LETELLIER et al., 2017). Na faixa de 300-700 nm (figura 4B), o CuSO_4 isolado não apresentou picos definidos, mas sua associação com a gelatina promoveu aumento da linha de base, o que pode estar relacionado à formação de complexos proteína-metal ou à alteração do índice de refração do meio.

Tais interações já foram descritas em estudos de bioinorgânica, que apontam o cobre como capaz de se ligar a resíduos como histidina e cisteína, modificando propriedades ópticas sem necessariamente gerar picos de absorção marcantes (KAUR et al., 2020).

Esses resultados reforçam a utilidade da espectrofotometria como técnica inicial para investigar interações fracas entre proteínas e moléculas externas. Embora as modificações detectadas tenham sido sutis, elas indicam que os corantes apresentam baixa afinidade, ao passo que o CuSO_4 estabelece interações mais significativas, com potencial para alterar propriedades físico-químicas da proteína.

No âmbito biológico, essas interações sugerem que os corantes são adequados para aplicações laboratoriais justamente por não comprometerem a integridade proteica. Já o cobre, ao se ligar a resíduos como histidina e cisteína, pode modificar a estabilidade e a função de proteínas estruturais, implicando tanto em aplicações farmacológicas (complexos proteína-metal) quanto em riscos toxicológicos, uma vez que o excesso de cobre está associado a processos de estresse oxidativo e patologias teciduais (LETELLIER et al., 2017; KAUR et al., 2020).

5.3 Cultura de células HFF

As culturas celulares foram organizadas em oito painéis (A-H), sendo A e B correspondentes ao controle, C e D às células tratadas com 0,0001% do composto, E e F às tratadas com 0,001% e G e H às tratadas com 0,01%, todos os pares representando as análises nos momentos de 0h e 24h, respectivamente.

Nas figuras 5, 6 e 7, são demonstradas as imagens do tratamento de células HFF com os diferentes compostos estudados.

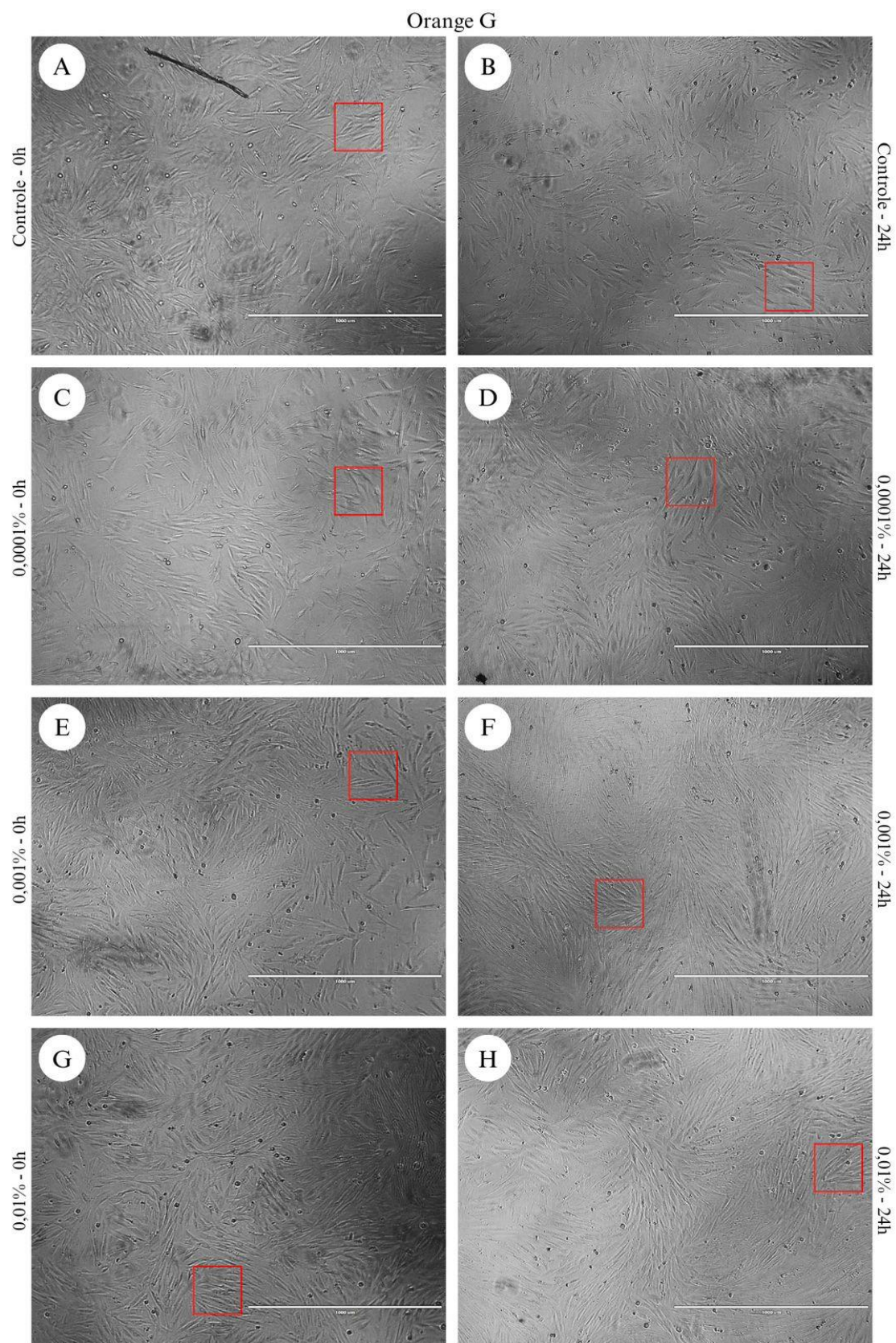


Figura 5: Cultura de fibroblastos humanos (HFF) tratados com Orange G em diferentes concentrações (A, B = controle; C, D = 0,0001%; E, F = 0,001%; G, H = 0,01%; 0h-24h, respectivamente).

Na figura 5, no controle (A-B), as células mantiveram morfologia fibroblástica típica, com disposição fusiforme e adesão adequada à placa de cultura. Nos tratamentos com 0,0001% e 0,001% (C-F), não foram observadas alterações relevantes em relação ao controle, mantendo-se confluência e morfologia preservadas após 24h. Apenas na maior concentração, 0,01% (G-H), observou-se discreta redução da confluência e leve diminuição da adesão após 24h.

O Orange G é um corante aniônico utilizado como marcador em eletroforeses, com baixa afinidade por domínios hidrofóbicos de membranas, o que limita sua penetração intracelular (BANCROFT; GAMBLE, 2008; HARVEY, 2010; MURPHY, 2001). Essa característica explica a ausência de alterações significativas em baixas concentrações.

Estudos comparativos indicam que o Orange G apresenta menor citotoxicidade em células do que outros corantes azo (LILLIE, 1977; IWASAKI et al., 2015). Assim, a discreta alteração a 0,01% pode estar mais relacionada ao estresse químico leve ou à interferência óptica do corante no meio do que a um efeito tóxico direto.

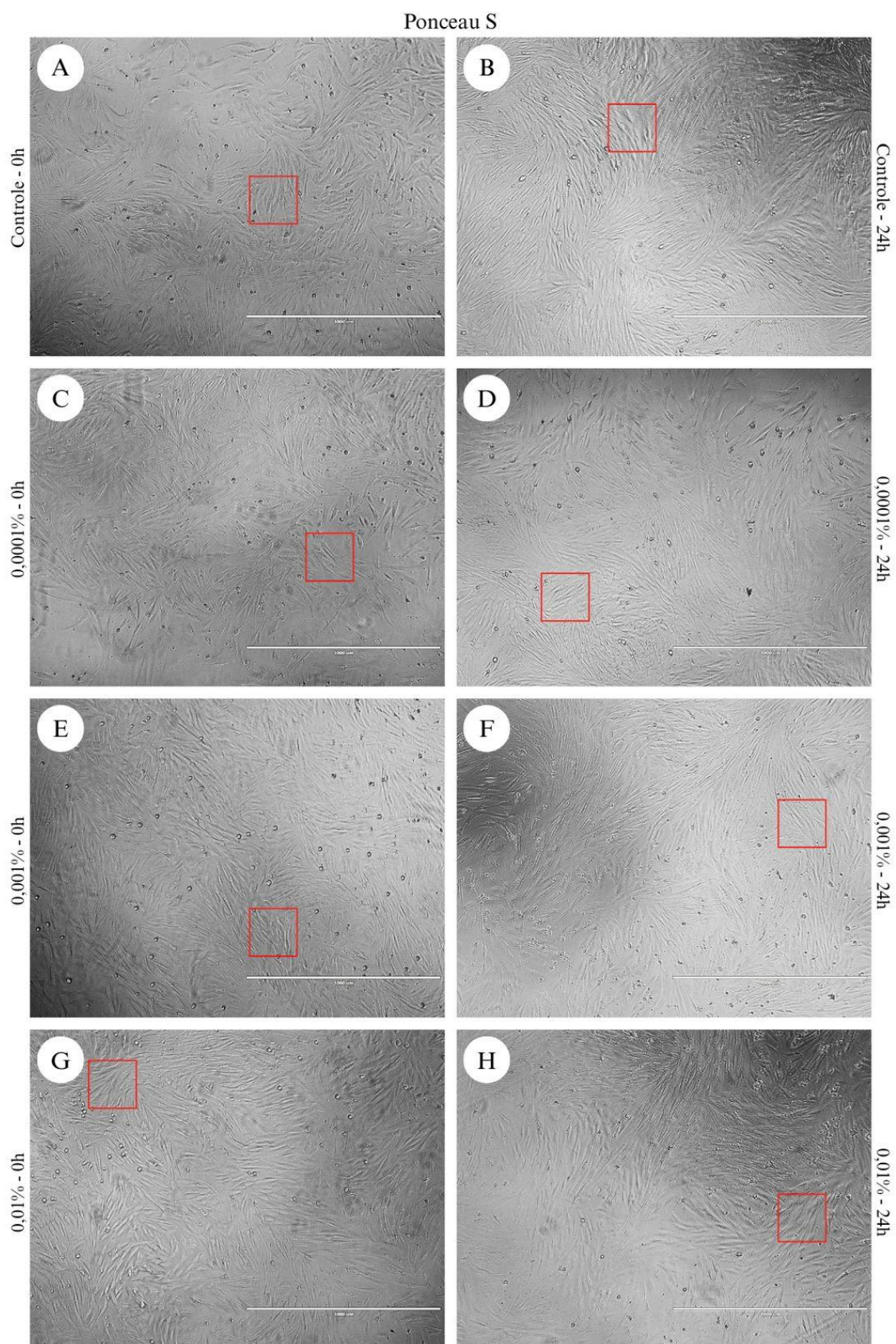


Figura 6: Cultura de fibroblastos humanos (HFF) tratados com Ponceau S em diferentes concentrações (A, B = controle; C, D = 0,0001%; E, F = 0,001%; G, H = 0,01%; 0h-24h, respectivamente).

Na figura 6, no controle (A-B), bem como nas concentrações de 0,0001% e 0,001% (C-F), as células mantiveram adesão e morfologia normais após 24h. Na concentração de 0,01% (G-H), verificou-se leve redução da confluência em relação ao controle, porém sem presença significativa de células mortas ou detritos.

O Ponceau S é amplamente utilizado em colorações transitórias de proteínas, justamente por sua fraca ligação reversível e baixa toxicidade (BLOTTNER & CZECH, 1992).

Dessa forma, os resultados obtidos estão de acordo com a literatura, indicando que o corante apresenta segurança em concentrações baixas e apenas leve interferência visual em concentrações mais altas, possivelmente associada à alteração óptica do meio de cultura (MATSUMOTO et al., 2021).

Sulfato de cobre

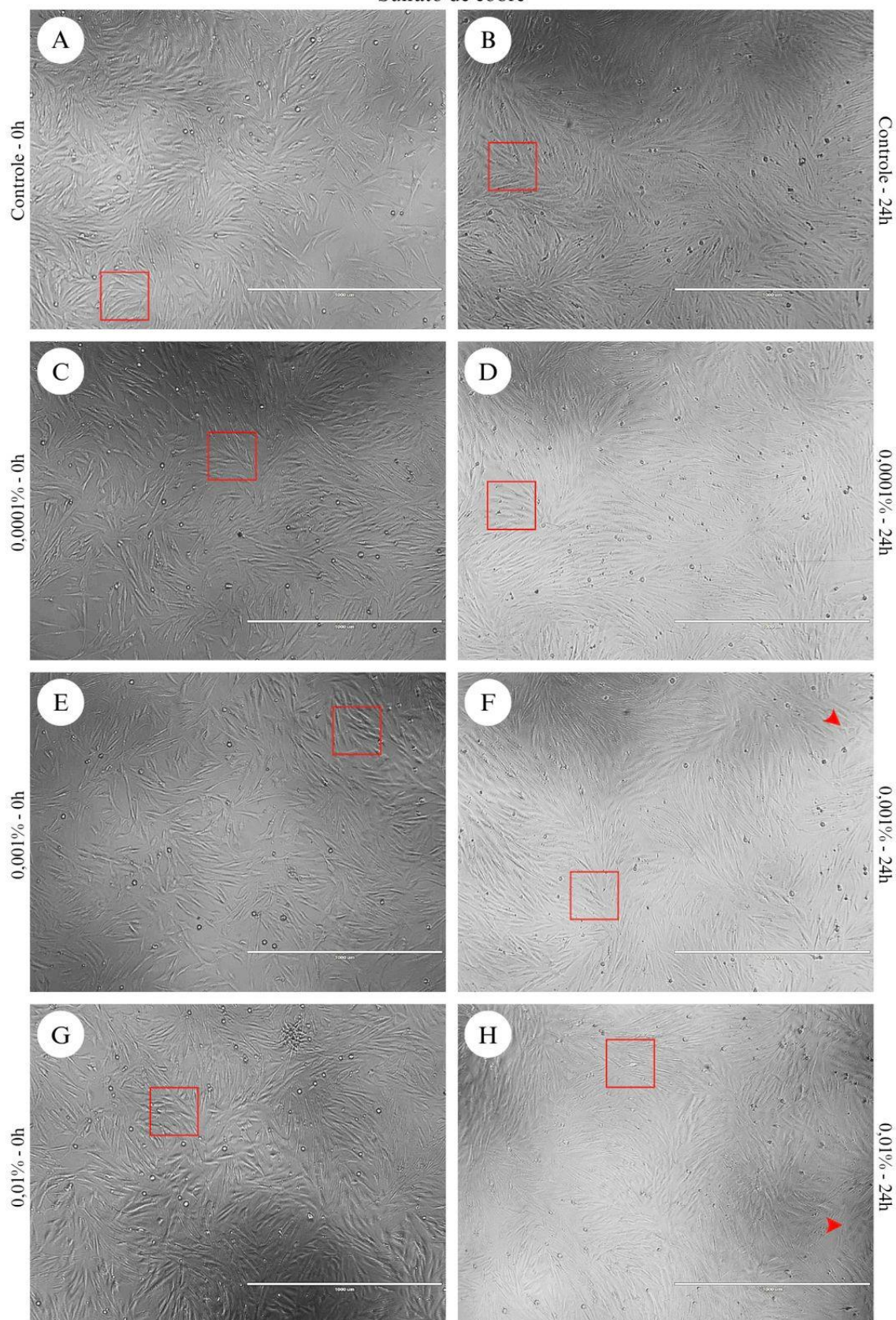


Figura 7: Cultura de fibroblastos humanos (HFF) tratados com CuSO_4 em diferentes concentrações (A, B = controle; C, D = 0,0001%; E, F = 0,001%; G, H = 0,01%; 0h-24h, respectivamente).

Na figura 7, no controle (A-B), as células apresentaram adesão e morfologia preservadas. A 0,0001% ($\approx 4 \mu\text{M}$, C-D), não foram observadas alterações após 24h. Já em 0,001% ($\approx 40 \mu\text{M}$, E-F), notou-se discreta perda de adesão em área pontuais (destaque com quadrado vermelho na imagem) e presença de algumas células arredondadas após 24h, sugerindo possível início de estresse celular. Imagens similares foram observadas também na concentração, 0,01% ($\approx 400 \mu\text{M}$, G-H).

O cobre é descrito como indutor de estresse oxidativo e de retículo endoplasmático, ativando vias apoptóticas em fibroblastos e promovendo perda de adesão (LETELLIER et al., 2017; KAUR et al., 2020). Estudos relatam que concentrações superiores a $200 \mu\text{M}$ já são capazes de induzir danos celulares importantes (BRADY et al., 2014), o que confirma a correlação entre a toxicidade observada e a dose utilizada neste estudo.

Assim, a análise morfológica sugere que tanto o Orange G quanto o Ponceau S são relativamente seguros para fibroblastos humanos até 0,001% em 24h, enquanto o CuSO_4 apresenta pode apresentar citotoxicidade dose-dependente. A escolha dos fibroblastos HFF como modelo experimental é relevante, já que se tratam de células primárias amplamente aplicadas em estudos de matriz extracelular e biomateriais (JIN et al., 2018; ZHANG et al., 2020; VAN DEN BROECK et al., 2021).

Além da avaliação de toxicidade, esses resultados têm implicações práticas importantes: (i) os corantes podem ser utilizados em protocolos experimentais sem prejuízo da viabilidade celular em concentrações baixas, validando seu uso em bioengenharia e cultura celular; (ii) o efeito tóxico do CuSO_4 em fibroblastos confirma seu potencial de risco em exposições ambientais e ocupacionais, uma vez que fibroblastos são centrais para regeneração tecidual e manutenção da matriz extracelular (DANG et al., 2019; DAI et al., 2021). Portanto, o trabalho contribui tanto para a padronização de ensaios espectrofotométricos e ensaios celulares futuros envolvendo os compostos estudados.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos demonstraram que a gelatina é um modelo experimental adequado para simular o colágeno desnaturado, apresentando perfil polidisperso confirmado por eletroforese. A espectrofotometria evidenciou que os corantes Orange G e Ponceau S mantêm estabilidade espectral e interações fracas com a proteína, enquanto o CuSO_4 apresentou maior afinidade, promovendo alterações ópticas compatíveis com complexos proteína-metal. Nos ensaios celulares, os corantes mostraram-se seguros até 0,001%, com apenas discretas alterações em 0,01%. Assim, conclui-se que os corantes avaliados podem ser aplicados em estudos experimentais sem comprometer a viabilidade celular em baixas concentrações, enquanto o cobre exige cautela devido ao seu caráter tóxico previamente descrito na literatura.

Dessa forma, este estudo reforça a utilidade da gelatina como modelo experimental em pesquisas com proteínas e biomateriais. Os resultados têm aplicações práticas diretas: (i) validação de concentrações seguras de corantes para uso em cultura de células, (ii) indicação de que o cobre, mesmo em baixas doses, deve ser manuseado com cautela em contextos biomédicos e ambientais, e (iii) suporte para futuros estudos em bioengenharia de tecidos, toxicologia e desenvolvimento de materiais baseados em colágeno hidrolisado. Assim, a pesquisa não apenas contribui para o entendimento básico das interações proteína-molécula, mas também oferece subsídios para aplicações em saúde e biotecnologia.

8. REFERÊNCIAS

BAI, J. et al. Preparation and characterization of collagen-based composites for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 103, n. 2, p. 896–906, 2015. DOI: 10.1002/jbm.a.35224.

BAI, Y. et al. Collagen-based hydrogels with tunable structures and properties for tissue engineering. *Polymers*, v. 7, n. 10, p. 2285-2301, 2015. DOI: 10.3390/polym7101506.

BÄCHINGER, H. P. et al. Collagen formation and structure. In: MÜLLER, G.; WANG, L. (Ed.). *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*. Vol. 5. Elsevier Ltd, 2010. p. 469-530.

BANCROFT, J. D.; GAMBLE, M. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 6. ed. London: Churchill Livingstone Elsevier, 2008.

BIRK, D. E. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron*, v. 32, n. 3, p. 223–237, 2001. DOI: 10.1016/S0968-4328(00)00043-3.

BLOTT, N.; SPILLER, S.; BOUCHER, P. Visualization of protein-DNA interactions in vivo using reversible fluorescent staining with Ponceau S. *Analytical Biochemistry*, v. 414, n. 2, p. 194-196, 2011. DOI: 10.1016/j.ab.2011.03.016.

BLOTTNER, S.; CZECH, G. Comparative evaluation of protein determination methods in tissue extracts after electrophoresis and electroblotting onto nitrocellulose membranes. *Electrophoresis*, v. 13, n. 9-10, p. 722-728, 1992. DOI: 10.1002/elps.11501301156.

CARTER, P.; RAZA, S. Spectroscopic analysis of proteins. *Methods in Enzymology*, v. 61, p. 382-392, 1979.

CROWLEY, D. C. et al. Safety and efficacy of undenatured type II collagen in the treatment of osteoarthritis of the knee: a clinical trial. *International Journal of Medical Sciences*, v. 6, n. 6, p. 312-321, 2009. DOI: 10.7150/ijms.6.312.

DAI, C. et al. Copper sulfate induces oxidative stress and apoptosis in chicken spleen via mitochondrial pathway. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 207, p. 111227, 2021. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111227.

DAI, C. et al. Molecular insights of copper sulfate exposure-induced nephrotoxicity: involvement of oxidative and endoplasmic reticulum stress pathways. *Biomolecules*, v. 10, n. 7, p. 1010, 2020. DOI: 10.3390/biom10071010.

DANG, F. et al. Copper induces oxidative stress and apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *Toxicology In Vitro*, v. 55, p. 37-44, 2019. DOI: 10.1016/j.tiv.2018.11.011.

EYRE, D. R. et al. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Research*, v. 4, n. 1, p. 30-36, 2002. DOI: 10.1186/ar382.

FERREIRA, A. M. et al. Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, v. 10, n. 9, p. 3855-3869, 2020. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.04.017.

FERREIRA, D. Aplicações biomédicas de colágeno: uma revisão. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento*, v. 8, n. 2, p. 85-102, 2020.

GARCÍA-RODRÍGUEZ, A. et al. In vitro toxicity of silver nanoparticles in human skin fibroblasts (HFF-1). *Toxicology Letters*, v. 298, p. 1-12, 2018. DOI: 10.1016/j.toxlet.2018.06.1214.

GIRKONTAITE, I. et al. Type X collagen gene expression in normal and pathological human tissues. *Matrix Biology*, v. 15, n. 8-9, p. 647-653, 1996. DOI: 10.1016/S0945-053X(96)90153-5.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: a review. *Food Hydrocolloids*, v. 25, n. 8, p. 1813-1827, 2011. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2011.02.007.

GULER, M. T. et al. Characterization of edible gelatin films enriched with plant extracts for active packaging. *Food Bioscience*, v. 35, p. 100577, 2020. DOI: 10.1016/j.fbio.2020.100577.

HARVEY, M. A. Electrophoresis of proteins and nucleic acids: a practical approach. In: ROSE, N. R.; MACARIO, E. C. (Ed.). *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 7. ed. Washington, DC: ASM Press, 2010. p. 197-205.

IWASAKI, T. et al. Mutagenicity and cytotoxicity of food dyes in DNA repair-proficient and -deficient strains of chicken DT40 cells. *Toxicology Reports*, v. 2, p. 1033-1039, 2015. DOI: 10.1016/j.toxrep.2015.07.006.

JIN, H. et al. Matrix stiffness regulates cellular behavior through cytoskeletal tension and YAP. *Journal of Cell Science*, v. 131, n. 7, p. jcs215197, 2018. DOI: 10.1242/jcs.215197.

JIN, S. G. et al. Effects of collagen I and III on the adhesion, proliferation and differentiation of human foreskin fibroblasts. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 41, n. 3, p. 1031-1038, 2018. DOI: 10.3892/ijmm.2017.3314.

KAUR, H. et al. Copper induces endoplasmic reticulum stress, autophagy, and apoptosis in lung epithelial cells. *Biometals*, v. 33, n. 2-3, p. 233-243, 2020. DOI: 10.1007/s10534-020-00240-6.

KHOSHNOODI, J. et al. Mammalian collagen IV. *Cell and Tissue Research*, v. 331, n. 1, p. 1-10, 2008. DOI: 10.1007/s00441-007-0485-4.

LETELLIER, R. et al. Copper induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 113, p. 176-185, 2017. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.023.

LILLIE, R. D. H. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 1977.

MAKRIDIS, P.; LOVDAHL, P.; NORDLUND, H. Gelatine as a protein model in food and biomedical applications: a critical review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 112, p. 97-113, 2021. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.03.037.

MALFAIT, F. et al. The 2017 international classification of the Ehlers-Danlos syndromes. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, v. 175, n. 1, p. 8-26, 2017. DOI: 10.1002/ajmg.c.31552.

MATSUMOTO, H. et al. A safe and rapid protein staining method for polyacrylamide gels using Ponceau S. *Analytical Biochemistry*, v. 626, p. 114224, 2021. DOI: 10.1016/j.ab.2021.114224.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

MURPHY, M. J. Histological techniques: Orange G. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. London: Nature Publishing Group, 2001.

NARAYANAN, S. S.; RATH, N. C. UV-Visible spectroscopy of proteins. *Current Protocols in Protein Science*, v. 88, p. e77, 2017. DOI: 10.1002/cpps.77.

NIKOO, M. et al. Extraction and characterization of gelatin from fish skin by different drying methods: molecular and functional properties. *LWT – Food Science and Technology*, v. 68, p. 563-571, 2016. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.12.028.

POSTLETHWAITE, A. E. et al. Collagen and collagen-derived peptides in wound healing and tissue repair. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1782, n. 2, p. 100-109, 2008. DOI: 10.1016/j.bbadis.2007.10.002.

RICARD-BLUM, S. The collagen family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 3, n. 1, p. a004978, 2011. DOI: 10.1101/cshperspect.a004978.

ROMERO-CANELÓN, I. et al. Reversible staining of proteins on membranes and gels with Ponceau S. *Analytical Biochemistry*, v. 472, p. 1-4, 2015. DOI: 10.1016/j.ab.2015.03.026.

SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*, v. 78, p. 929–958, 2009. DOI: 10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.

SILVA, T. H. et al. Marine origin collagens and its potential applications. *Marine Drugs*, v. 12, n. 12, p. 5881-5901, 2014. DOI: 10.3390/md12125881.

SINGH, A.; SHARMA, P. R. Gelatin and gelatin-based hydrogels: preparation, properties, and biomedical applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 63, p. 102431, 2021. DOI: 10.1016/j.jddst.2021.102431.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Protein secondary structure from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Analytical Biochemistry*, v. 287, n. 2, p. 252-260, 2000. DOI: 10.1006/abio.2000.4880.

VAN DEN BROECK, D. et al. Fibroblast–biomaterial interaction on a gelatin hydrogel with specific stiffness modulates cell proliferation and migration. *Tissue Engineering Part A*, v. 27, n. 9-10, p. 708–720, 2021. DOI: 10.1089/ten.tea.2020.0282.

VAN DEN BROECK, H. C. et al. Fibroblast culture as a model for extracellular matrix biology. *Matrix Biology Plus*, v. 12, p. 100092, 2021. DOI: 10.1016/j.mbplus.2021.100092.

XU, R. et al. Extracellular matrix stiffness promotes the invasive phenotype of melanoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 512, n. 2, p. 360-365, 2019. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.03.080.

XU, S. et al. Collagen I promotes epithelial–mesenchymal transition and tumor progression in melanoma via activation of integrin/FAK signaling pathway. *International Journal of Oncology*, v. 54, n. 5, p. 1639-1650, 2019. DOI: 10.3892/ijo.2019.4764.

ZHANG, X. et al. Human foreskin fibroblasts as a model for wound healing and skin regeneration research. *Journal of Dermatological Science*, v. 97, n. 2, p. 77-86, 2020. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2019.12.009.